

DT09 Rec'd PCT/PTO 11 MAR 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Kazuko MATSUMOTO **PCT Branch**  
Appl. No. : Not Yet Assigned (National Phase of PCT/JP2003/011900)  
Filed : Concurrently Herewith (I.A. Filed September 18, 2003)  
For : METHOD FOR MEASURING COLLAGEN

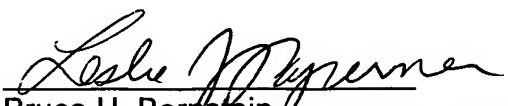
**CLAIM OF PRIORITY**

Commissioner for Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
Customer Service Window, Mail Stop \_\_\_\_\_  
Randolph Building  
401 Dulany Street  
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application No. 2002-271200, filed September 18, 2002. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,  
Kazuko MATSUMOTO

  
Bruce H. Bernstein  
Reg. No. 29,027  
Leslie J. Paperner  
Reg. No. 33,329

March 10, 2005  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1950 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

01 AM

Rec'd PCT/PTO

11 MAR 2005

PCT/JP 03/11900

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

18.09.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年 9月18日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-271200  
[ST. 10/C]: [JP 2002-271200]

RI 00 06 NOV 2003

Wipo PCT

出 願 人  
Applicant(s): 工藤 憲雄

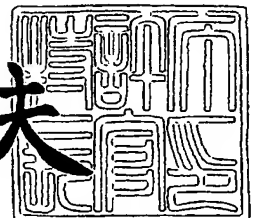
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A21632A

【提出日】 平成14年 9月18日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県朝霞市栄町 5-8-9 ローランドハウス 3F

    【氏名】 小林 達昌

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区代々木 1-44-9-403

    【氏名】 木村 博子

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区本郷 2-32-2-1203

    【氏名】 富野 康日己

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢 3-9-12-105

    【氏名】 松本 和子

【特許出願人】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区初台 1-37-11-309

    【氏名又は名称】 工藤 憲雄

【代理人】

    【識別番号】 110000109

    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

    【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 170347

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

【物件名】            要約書    1  
【プルーフの要否】    要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コラーゲンの測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗コラーゲン抗体を用いる免疫分析によるコラーゲンの測定方法において被験試料を還元剤で処理することを特徴とする、コラーゲンの測定方法。

【請求項 2】 免疫分析が抗コラーゲン抗体を用いる蛍光イムノアッセイである、請求項 1 に記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 3】 免疫分析が、サンドイッチ式時間分解蛍光イムノアッセイ（TR-FIA）である、請求項 1 又は 2 に記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 4】 コラーゲンが I V 型コラーゲンである、請求項 1 から 3 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 5】 還元剤がジチオトレイトールである、請求項 1 から 4 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 6】 被験試料が尿である、請求項 1 から 5 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 7】 被験試料が実験動物の尿である、請求項 1 から 6 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 8】 被験試料中の還元剤の濃度が 0.1 mM から 10 mM である、請求項 1 から 7 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 9】 被験試料中の還元剤の濃度が 0.1 mM から 5 mM である、請求項 8 に記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 10】 被験試料中の還元剤の濃度が 0.5 mM から 5 mM である、請求項 8 に記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 11】 下記の工程；

- （1）被験試料を還元剤で処理する工程；
- （2）抗コラーゲン固相化抗体を固定化した固相担体に、上記（1）で処理した被験試料を接触させる工程；
- （3）上記固相担体に、標識物質を有する抗コラーゲン標識抗体を接触させる工

程；及び、

(4) 上記標識物質を利用して、抗コラーゲン固相化抗体に結合したコラーゲンを検出又は測定する工程；

を含む、請求項 1 から 10 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法。

【請求項 12】 少なくとも還元剤と抗コラーゲン抗体とを含む、請求項 1 から 11 の何れかに記載のコラーゲンの測定方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コラーゲンの測定方法、より詳細には、少量の試料において高感度でコラーゲンを測定する方法、並びにコラーゲンの測定を行うためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

I V型コラーゲンは、腎組織の腎糸球体及び尿細管から放出される腎細胞外基質の主要成分の一つである (T. Iijima, 他、J. Clin. Lab. Anal., 1998, 12, 378-382)。I V型コラーゲンの尿への排出は、病的腎臓における I V型コラーゲンの産生亢進の結果として各種腎疾患の進行に伴って増加する。

【0003】

糖尿病性腎症の良好な指標を探索することを目的とした最近の臨床試験によれば、尿中の I V型コラーゲン量は亢進している細胞外基質の代謝の速さを正確に反映していると考えられている (H. Okonogi, 他、Clin. Nephrol., 2001, 55, 357-364; H. Makino, 他、Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 1995, 88, 215-223; 及び、M. P. Cohen, 他、Diabetes Care, 2001, 24, 914-918)。また、I V型コラーゲンは糖尿病性腎症などの腎疾患において尿アルブミンよりも優れた指標である (T. Iijima, 他、J. Clin. Lab. Anal., 1998, 12, 378-382; M. P. Cohen, 他、Diabetes Care, 2001, 24, 914-918; N. Banu, 他、Diabetes Res. Clin. Pract., 1995, 29, 57-67; 及び N. Kotajima, 他、J. Diabetes Complications, 2000, 14, 13-17)。ヒト I V型コラーゲンを測定するための各

種の ELISA 及びラジオイムノアッセイ (RIA) が臨床検査で使用されているが (J. Risteli, 他、Anal. Biochem., 1981, 113, 372-378; 及び K. Obata, 他、Clin. Chim. Acta., 1989, 181, 293-304)、極少量の検体量で尿中の微量なコラーゲンを測定することを可能にする実用的なマウス I V 型コラーゲンの測定方法は存在しない。

#### 【0004】

I V 型コラーゲンは、自己凝集性を含む独特な構造的特徴を有する巨大なポリマーである (R. Timpl, 他、Eur. J. Biochem., 1981, 120, 203-211; P. D. Yurchenco, 他、Biochem., 1984, 23, 1839-1850; P. D. Yurchenco, 他、J. Histochem. Cytochem., 1986, 34, 93-102; C. Johansson, 他、J. Biol. Chem., 1992, 267, 24533-24537; B. Siebold, 他、Eur. J. Biochem., 1987, 168, 569-575; P. D. Yurchenco, 他、J. Cell Biol., 1987, 105, 2559-2568; 及び R. Dolz, 他、Eur. J. Biochem., 1988, 178, 357-366)。I V 型コラーゲン分子は各々、3つのドメイン (即ち、N末端領域の小さなコラーゲン性ドメインである 7S、中間領域の大きなコラーゲン性ドメイン、及び C末端領域の非コラーゲン性球状ドメインである NC1) に分けることができる 3本の  $\alpha$  鎖から構成される。 $\alpha$  鎖の 3量体は 7S 及び大きなコラーゲン性ドメインでは 3重らせんに組織化されているが、NC1 ドメインでは各鎖は球構造に折り畳まれ、鎖内のジスルフィド結合により安定化されている。架橋ドメインとして 7S 及び NC1 ドメインを使用することにより、4つの I V 型コラーゲン分子が 7S ドメイン中で結合し、2個の分子が NC1 ドメイン中で結合し、I V 型コラーゲン分子の巨大な多角形ネットワークが生成する (R. Timpl, 他、Eur. J. Biochem., 1981, 120, 203-211)。我々が特に注目した重要な構造的特徴は、ジスルフィド架橋が主要な結合として働き、分子内架橋の 88% で使用され、各ユニットを結合することにより多角形の巨大ネットワークを形成していることである (B. Siebold, 他、Eur. J. Biochem., 1988, 176, 617-624)。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明が解決しようとする課題は、マウスの尿などの少量の試料しか得られな

い場合であっても、少量の試料中の微量のコラーゲンを測定することを可能にするコラーゲンの新規な測定方法を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、実験モデルマウスにおける早期腎障害を正確に反映させることを目的として、非常に少量の検体量で微量にしか存在しないマウス尿中 I V 型コラーゲン量を測定するための高感度時間分解蛍光イムノアッセイ (TR-FIA) を確立することを試みた。本発明者らは先ず、上記したような I V 型コラーゲンの構造上の特徴に基づいて、試料をジチオトレイトールで前処理し、分子間ジスルフィド架橋の数を減少させた。ジチオトレイトールによる前処理により、多量の尿を必要とすることなく、マウス尿中の I V 型コラーゲンをより正確に測定することが可能になった。本発明の方法と D T T を使用しない通常の競合的 E L I S A 法を用いて、K K / T a マウス (自然発症 I I 型糖尿病モデルマウス、H. Ikeda, Diabetes Res. Clin. Pract., 1994, 24 (Suppl.), 313-316) 及び糖尿病を呈しないコントロールマウスとして B A L B / c マウスの両方を用いて尿中の I V 型コラーゲンの量を比較した結果、本発明の方法の有用性が確認された。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0007】

即ち、本発明によれば、抗コラーゲン抗体を用いる免疫分析によるコラーゲンの測定方法において被験試料を還元剤で処理することを特徴とする、コラーゲンの測定方法が提供される。

【0008】

好ましくは、免疫分析は抗コラーゲン抗体を用いる蛍光イムノアッセイであり、さらに好ましくは、サンドイッチ式時間分解蛍光イムノアッセイ (TR-FIA) である。

好ましくは、コラーゲンは I V 型コラーゲンである。

好ましくは、還元剤はジチオトレイトールである。

好ましくは、被験試料が尿であり、さらに好ましくは、実験動物の尿である。

【0009】



好ましくは、被験試料中の還元剤の濃度は0.1 mMから10 mMであり、より好ましくは0.1 mMから5 mMであり、さらに好ましくは0.5 mMから5 mMである。

#### 【0010】

本発明のコラーゲンの測定方法は、好ましくは、下記の工程；

- (1) 被験試料を還元剤で処理する工程；
  - (2) 抗コラーゲン固相化抗体を固定化した固相担体に、上記(1)で処理した被験試料を接触させる工程；
  - (3) 上記固相担体に、標識物質を有する抗コラーゲン標識抗体を接触させる工程；及び、
  - (4) 上記標識物質を利用して、抗コラーゲン固相化抗体に結合したコラーゲンを検出又は測定する工程；
- を含む。

#### 【0011】

本発明の別の側面によれば、少なくとも還元剤と抗コラーゲン抗体とを含む、コラーゲンの測定方法を行うためのキットが提供される。

#### 【0012】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明によれば、マウス尿中 I V 型コラーゲンなどの微量のコラーゲンを測定するための高感度のイムノアッセイ法が提供される。本発明では、I V 型コラーゲン分子の構造上の特徴に基づいて、ジチオトレイトール (D T T) を用いて被験試料の前処理を行う。D T T 処理を行わない従来の競合的 E L I S A における検出限界は  $2.4 \text{ ng/ml}$  であるのに対し、本発明の方法によれば、 $5 \mu\text{l}$  の尿試料中の  $27 \text{ pg/ml}$  の I V 型コラーゲンを測定することが可能である。

#### 【0013】

本発明の方法により、2 種類のマウス系統 (K K / T a 及び B A L B / c) の 12 試料に由来する尿中 I V 型コラーゲン量を測定した結果、糖尿病マウスと糖尿病でないマウスでは尿中の I V 型コラーゲン量が明らかに異なることが判明し

た。D T Tによる前処理を行わない場合と比較して、本発明の方法は 極少量の試料でも測定可能であることから、検体量に限りのある特にマウスの尿中 I V 型コラーゲンの測定に適している。

#### 【0014】

本発明の抗コラーゲン抗体を用いる免疫分析によるコラーゲンの測定方法においては、被験試料を還元剤で処理することを特徴とする。

本発明で用いる被験試料としては、コラーゲン量を測定する必要のあるものであれば特に限定されず、例えば、ヒト又はラットやマウスなどの哺乳動物の尿、血液、血清、血漿、組織液、唾液、汗等の任意の体液が挙げられる。本発明のコラーゲンの測定方法は、微量の試料中の少量のコラーゲンでも高感度に測定することができることから、通常は少量しか採取されず、多量の試料を集めることが困難であるマウスなどの実験動物の尿などを被験試料として用いることができる。

#### 【0015】

本発明で測定するコラーゲンの種類は特に限定されない。脊椎動物のコラーゲンは I 型から X X V 型に分類することができ、本発明ではこのうちの何れの型のコラーゲンを測定してもよい。本発明では、これらの中でも特に好ましくは、I V 型コラーゲンを測定することができる。

#### 【0016】

本発明で用いる還元剤は、コラーゲン中のジスルフィド結合を還元することができる還元剤であれば特に限定されず、例えば、ジチオトレイトール (D T T)、 $\beta$ -メルカプトエタノールなどを使用できる。特に好ましくは、ジチオトレイトール (D T T) を使用することができる。

#### 【0017】

本発明の方法では、被験試料を上記した還元剤で予め処理する。還元剤による処理の際における被験試料中の還元剤の濃度は、好ましくは 0.1 mM から 10 mM、より好ましくは 0.1 mM から 5 mM、さらに好ましくは 0.5 mM から 5 mM であり、例えば、約 2 mM とすることができる。還元剤の濃度が 0.1 mM 未満であると、還元剤によるジスルフィド結合の還元作用が十分に発揮されず

、また還元剤の濃度を 10 mM より高いと、コラーゲン分子のエピトープの立体構造に悪影響を与える可能性があるため、好ましくない。

#### 【0018】

本発明の免疫分析は、抗コラーゲン抗体を用いる免疫分析である。

本発明で用いる抗コラーゲン抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、これらの抗体は、通常の抗体の作成方法により取得することができる。また、抗体としては、IgG だけでなく、抗体の断片（例えば、F(a b')<sub>2</sub> フラグメント、F a b' フラグメント等）を使用してもよい。

#### 【0019】

例えば、ポリクローナル抗コラーゲン抗体は、コラーゲンを抗原として哺乳動物を免疫感作し、該哺乳動物から血液を採取し、採取した血液から抗体を分離・精製することにより得ることができる。例えば、マウス、ハムスター、モルモット、ニワトリ、ラット、ウサギ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ウシ等の哺乳動物を免疫することができる。抗原投与の方法は当業者に公知であり、投与経路も特に限定されず、皮下投与、皮内投与、腹腔腔内投与、静脈内投与、筋肉内投与等を適宜選択することができる。また、必要に応じてアジュバントを使用することもできる。免疫感作した哺乳動物を適当な期間飼育した後、該哺乳動物の血清を耳静脈等から少量サンプリングし、抗体価を測定する。抗体価が上昇してきたら、状況に応じて抗原を投与して追加免疫を行なってもよい。最後の投与から 1～2 ヶ月後に免疫動物から通常の方法により血液を採取して、該血液を、例えば遠心分離、硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いた沈澱、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィー等の通常の方法によって分離・精製することにより、ポリクローナル抗血清として、ポリクローナル抗コラーゲン抗体を得ることができる。

#### 【0020】

また、モノクローナル抗体は、例えば、抗体産生細胞とミエローマ細胞株との細胞融合によりハイブリドーマを作製することにより取得することができる。抗体産生細胞としては、免疫された動物からの脾細胞、リンパ節細胞、B リンパ球

等を使用することができる。例えば、免疫動物から抗体産生細胞として脾細胞を取得し、これとミエローマ細胞と公知の方法 (G.Kohler et al., Nature, 256 495(1975)) により融合することにより、ハイブリドーマを作製することができる。細胞融合に使用するミエローマ細胞株としては、例えばマウスでは P 3 X 6 3 A g 8、P 3 U 1 株、S p 2 / 0 株などが挙げられる。細胞融合を行なうに際しては、ポリエチレングリコール、センダイウイルスなどの融合促進剤を用い、細胞融合後のハイブリドーマの選抜にはヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン (H A T) 培地を常法に従って使用することができる。細胞融合により得られたハイブリドーマは限界希釈法等によりクローニングする。更に、コラーゲンをを用いた酵素免疫測定法によりスクリーニングを行なうことにより、所望のコラーゲンを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する細胞株を得ることができる。ハイブリドーマから目的とするモノクローナル抗体を製造するには、通常の細胞培養法や腹水形成法により該ハイブリドーマを培養し、培養上清あるいは腹水から該モノクローナル抗体を精製すればよい。培養上清もしくは腹水からのモノクローナル抗体の精製は、常法により行なうことができる。例えば、硫酸分画、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせ使用できる。

#### 【0021】

本発明によるコラーゲンの測定方法としては、例えば蛍光免疫測定法、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、発光免疫測定法等を例示することができる。例えば、抗コラーゲン抗体を不溶性担体に結合させて抗体結合不溶性担体を調製し、この担体を用いてサンドイッチ式免疫測定法を行なうことができる。本発明の方法を、例えば、サンドイッチ式免疫分析を行う場合には、

- (1) 被験試料を還元剤で処理する工程；
- (2) 抗コラーゲン固相化抗体を固定化した固相担体に、(1) で処理した被験試料を接触させる工程；
- (3) 上記固相担体に、標識物質を有する抗コラーゲン標識抗体を接触させる工程；及び、
- (4) 上記標識物質を利用して、抗コラーゲン固相化抗体に結合したコラーゲン

を検出又は測定する工程；  
を含む工程により行うことができる。

#### 【0022】

標識抗体として使用する抗コラーゲン抗体には、標識物質、好ましくは非放射性標識物質により標識する。非放射性標識としては、酵素標識、蛍光標識、発光標識等の標識を用いることができる。酵素標識としては、例えば標識用酵素としてアルカリ性フォスファターゼ（ALP）、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ等を用いることができる。これらの酵素の検出には、それぞれの酵素基質であるそれぞれ、4-メチルウンベリフェリリン酸（4-MUP）、過酸化水素と3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジンの組合せ、2-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド等を用いることができる。これらの酵素基質は、酵素の作用を受けて変化（例えば開裂）することにより発色し、検出することができる。

#### 【0023】

免疫分析の測定方法をその機器の測定原理により分類すると下記を挙げることができるが、本発明ではこれらの何れの方法を使用してもよい。

#### 【0024】

##### （A）化学発光免疫測定装置

1. CLEIA (Chemical Luminescent Enzyme Immuno Assay) (酵素を用いて化学発光を起こす)
2. CLIA (Chemical Luminescent Immuno Assay) (触媒を用いて化学発光を起こす)
3. ECLIA (Electro Chemical Luminescent Immuno Assay) (電気的変化によって化学発光を起こす)

#### 【0025】

##### （B）ラジオイムノアッセイ測定装置

1. ラジオイムノアッセイ (Radio Immuno Assay; RIA) 競合法
2. イムノラジオメトリック法 (Immuno Radio Metric Assay; IRMA)

#### 【0026】

## (C) 酵素免疫測定装置

1. エンザイムイムノアッセイ (Enzyme Immuno Assay; EIA)
2. E L I S A 法 (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

【0027】

## (D) 蛍光、蛍光偏向免疫測定装置

1. 蛍光エンザイムイムノアッセイ (Fluorescent Enzyme Immuno Assay; FEIA)  
)
2. 蛍光偏向イムノアッセイ (Fluorescent Polarization Immuno Assay; FPIA)  
)
3. 時間分解蛍光測定装置 (T R - F)

【0028】

## (E) ラテックス凝集免疫測定装置

## (F) ネフエロメトリック免疫測定装置

## (G) イムノセンサー

1. 電気化学免疫センサー
2. オプティカル免疫センサー
3. サーマル免疫センサー
4. ピエゾアコースティック免疫センサー

【0029】

本発明の免疫分析は好ましくは蛍光イムノアッセイであり、特に好ましくは、サンドイッチ式時間分解蛍光イムノアッセイ (T R - F I A) である。

三価希土類イオンの中で、サマリウム (S m)、ユウロピウム (E u)、テルビウム (T b) およびジスプロシウム (D y) イオンは特定の配位子と錯生成をすると、金属イオン特有の蛍光を強く発することが知られている。これらの錯体の蛍光は以下のような特徴を有する: (1) 蛍光寿命が非常に長く、希土類蛍光錯体、特にユウロピウムとテルビウムの錯体は数百マイクロ秒以上の蛍光寿命を持つ; (2) ストークスシフトが非常に大きい。ほとんどの場合、これらの錯体は紫外光を吸収して励起され、500 nm以上の可視光を発する; (3) 蛍光発光ピークの半値幅が約10から20 nmであり、非常にシャープである。このような蛍光特性を利

用することにより、希土類蛍光錯体を標識物質として利用する時間分解蛍光イムノアッセイが開発されている。時間分解蛍光イムノアッセイでは、様々な短寿命のバックグラウンド蛍光をなくすことができ、高感度な測定が可能である。

### 【0030】

本発明はまた、コラーゲンの測定用キットを提供する。本発明のキットには、少なくとも還元剤と抗コラーゲン抗体とが含まれている。抗コラーゲン抗体は、固相化抗体及び標識抗体の2種類を含めてもよい。本発明のキットには、さらに、上記した標識物質を検出するための試薬を含めることもできる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

### 【0031】

#### 【実施例】

#### (A) 材料と方法

##### (1) 実験動物

動物実験は、順天堂大学の動物施設のガイドラインに従って行った。本実験のために、2種類の近交系のマウス（KK/TaおよびBALB/c）を日本クレア（東京、日本）から4週齢で購入した。6週齢以降から、マウスは、実験の全期間を通じて、食物（げっ歯動物ペレット食（CE-2；342.2 kcal/100g、4.4%粗脂肪を含有）および水を自由に摂取させながらプラスチックケージ中に個別に飼育した。雄マウスのみを本実験では使用した。マウスは全て、12時間の明期/12時間の暗期の規則的な光周期を伴う通常の下で同じ部屋で飼育し、温度は $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に調節した。20週齢で評価した糖負荷試験により、KK/Taが完全に糖尿病であることを示した。大量の尿が比較用に必要であったので、尿試料を10日間繰り返し採取した。耐糖能は、マウス用の腹腔内糖負荷試験（IPGTT）を使用して評価した。IPGTTは、一晩絶食したマウスにグルコース（20%溶液で2g/kg）を腹腔内注入することにより行った。後眼窩から採取された血液中グルコース量を、腹腔内へのグルコース注入後0分（空腹時血糖値）および120分に、Glutest E（京都第一化学、京都（日本））を使用して測定した。体重も同週令に測定した。

## 【0032】

## (2) 抗体及び抗原

ウサギポリクローナル抗マウス I V 型コラーゲン抗体は、NOVOTEC (St Martin La Garenne、フランス) から購入した。マウス I V 型コラーゲンと交差反応するビオチン化ヤギポリクローナル抗ヒト I V 型コラーゲン抗体は Abcam 社 (ケンブリッジ、英国) から得た。Engelbreth-Holm-Swarm 移植マウス腫瘍由来の I V 型コラーゲン (Sigma-Aldrich 社、St. Louis、MO、米国) を標準抗原として使用した。

## 【0033】

## (3) BHHCT によるストレプトアビジンの標識

ストレプトアビジンは、Chemicon International 社 (Temecula、CA、米国) から得た。ストレプトアビジン-BSA 結合体 (SA-BSA) は既報の通り調製した (J. Yuan, G. Wang, 他、Anal. Biochem., 1997, 254, 283-287)。SA-BSA 結合体を、キレート化合物 BHHCT で既報の通り標識した (J. Yuan, G. Wang, 他、Anal. Biochem., 1997, 254, 283-287)。溶液は、 $1.0 \times 10^{-7}$  M  $\text{EuCl}_3$ , 0.2% BSA, 0.1%  $\text{NaN}_3$  及び 0.9% NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) (希釈緩衝液) を添加することによって希釈し、イムノアッセイに使用する前の 2 時間 56℃ で反応させた。

## 【0034】

## (4) 時間分解蛍光イムノアッセイ (TR-FIA) を用いたマウス尿 I V 型コラーゲンの測定

尿試料を等量の 2 mM ジチオトレイトール (Invitrogen 社、CA、米国) と共に 37℃ で 30 分間インキュベートした。標準 I V 型コラーゲン溶液 (2000 ng/ml) も同様に 2 mM の DTT とインキュベートした。試料を希釈緩衝液で希釈後、50  $\mu$ l の尿又は標準溶液を、ウサギ抗マウス I V 型コラーゲン抗体 (1:200 希釈抗体 50  $\mu$ l / ウェル) を予め被覆した蛍光測定用マイクロタイタープレート (Nalge Nunc International, N.Y., 米国) のウェルに添加した。5℃ で一晩インキュベーションした後、ウェルを 0.05% の Tween 20 を含む トリス-HCl 緩衝液で 3 回洗浄し、50  $\mu$ l のビオチン化抗 I V 型コラーゲン抗体 (1:300 に



希釈) を添加した。5℃で一晩インキュベーションした後、50  $\mu$  l の B H H C T - E u<sup>3+</sup> 標識 S A - B S A 結合体 (S A - B S A - B H H C T - E u<sup>3+</sup>) 溶液を添加し、37℃で1時間インキュベートした。最後に、ウェルを0.05% Tween 20を含むトリス-HCl緩衝液(pH9.1)で3回洗浄し、プレートを固相蛍光測定に供した。時間分解蛍光測定を、Arvo SXマルチラベルカウンター (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, 米国) を用いて、340 nmで励起、0.2 msのデレイタイム、及び0.4 msのウィンドウタイムで行った。蛍光強度は615 nmで測定した。

#### 【0035】

##### (5) 競合的 E L I S A を用いたマウス尿 I V 型コラーゲンの測定

競合的酵素免疫測定法 (E L I S A) (コラーゲン IV M キット、Exocell 社、フィラデルフィア、PA、米国) を用いて尿 I V 型コラーゲンを測定した。アッセイはキットの指示に従って行い、240  $\mu$  l の尿試料を使用した。

#### 【0036】

##### (6) クレアチニンアッセイ

尿中クレアチニンは、尿試料用の市販キット (Creatinine Companion, Exocell 社、フィラデルフィア、PA、米国) を使用して測定した。

#### 【0037】

##### (7) I V 型コラーゲンの mRNA のノーザンブロット分析

ノーザンブロット分析に使用するプローブは既報の通り調製した (E. P. Peten, 他, Am. J. Physiol., 1992, 263, 951-957)。20週齢の KK/Ta および BALB/c マウスの全腎臓からの全 RNA の単離は、Trizol (Invitrogen 社、Carlsbad, CA, 米国) を用いて行った。RNA (10  $\mu$  g) を 1.5% アガロース上で電気泳動し、ナイロン膜に転写した。膜は4時間プレハイブリダイゼーションを行い、次いで、マウス I V 型コラーゲンの  $\alpha 1$  鎖及び及び G A P D H に対する <sup>32</sup>P 標識 cDNA プローブで一晩ハイブリダイズさせた。洗浄後、膜をイメージ・プレート (富士写真フイルム会社、東京、日本) に露出した。イメージ・プレート上のバンドの強度は、BAStation 2500 (富士写真フイルム会社、東京、日本) の濃度計走査モデルによって定量した。最後に、 $\alpha 1$  鎖のバンドの強度の補正は、G A P D H のバ

ンド強度で行った。

### 【0038】

#### (8) 統計分析

データは平均±SDとして表現した。2種の異なるマウス系統間の統計的有意差は、Mann-Whitney U検定によって測定した。ELISA及びTR-FIA間の回帰相関分析は、Spearmanの検定を用いて行った。0.05未満のP値を有意差ありとみなした。

### 【0039】

#### (B) 結果

##### (1) 競合的ELISAおよびTR-FIAシステム間の検出限界の比較

競合的ELISA及びTR-FIAによるマウスIV型コラーゲンの標準曲線は図1に示す。3×SDのバックグラウンドを用いて特定したTR-FIAの検出限界は、既報の方法を用いると、27 pg/mlである (J. Yuan, G. Wang, 他、Anal. Biochem., 1997, 254, 283-287)。同時に測定した際の、平均変動係数は4.2%であった (8種の異なる濃度で0.4~7.4%)。TR-FIAの検出限界 (27 pg/ml) は、競合的ELISAの検出限界より約1/10小さかった。尿試料への標準抗原の回収率を得るために、1:5に希釈したヒト尿を希釈剤として使用した。希釈したヒト尿中の5種の異なる濃度の標準マウスIV型コラーゲン (2.5、10、40、160、及び320 ng/ml) をアッセイした。ヒト尿試料に添加したマウスIV型コラーゲンの回収率は、各濃度で95%以上であった。

### 【0040】

#### (2) 希釈したマウス尿試料の分析

20週齢の糖尿病KK/Taおよび糖尿病を呈していないBALB/cマウスから採取した尿試料を使用して、尿のマウスIV型コラーゲンの濃度と蛍光強度の相関関係を調べた (図2)。各系統 (n=3) の尿試料を希釈緩衝液で希釈した。試料を前処理なしでアッセイした場合、蛍光強度は希釈1:20から1:2まで減少した (白四角で示す)。この傾向は、BALB/cマウスよりKK/Taマウスにおいてより顕著であった。KK/Taマウス尿中の抗原の低い回収率

は、I V型コラーゲンが多数のジスルフィド結合により巨大分子を呈していることによって引き起こされる可能性がある。これは、巨大分子のウェルへの非特異的付着を介した免疫反応の妨害が示唆している。そこで、マウス尿試料は、分析前にD T Tで処理した。

#### 【0041】

##### (3) D T T前処理による尿中I V型コラーゲン測定のための至適条件の検討

測定用の至適条件を確立するために、尿試料の前処理におけるD T T濃度の効果を検討した(図3 A)。D T T濃度を変化させた(1、2および5 mM)。結果は図3に示す。標準抗原も同様に処理した(図3 B)。両方の分析で、標準溶液は、2 mMのD T T濃度ではほとんど影響を受けず、尿試料中のI V型コラーゲンの最良の分析は2 mMで達成された。希釈前に2 mMの濃度のD T Tで前処理することにより、尿のI V型コラーゲン濃度と蛍光強度との間で正の相関関係がK K / T aマウスで観察された(図3 B中で黒四角で示す)。

#### 【0042】

マウスI型及びI I型コラーゲンなどの他の型のコラーゲンとの交差反応性を確認するために、両方の型のコラーゲンも2 mMのD T Tで処理した。これらの型のコラーゲンとの交差反応は観察されず、D T Tによる前処理がI型及びI I型等の他のコラーゲン分子に対して交差性を与えずに、I V型コラーゲンへの特異性が保たれることが確認された。

#### 【0043】

##### (4) K K / T a およびB A L B / cマウスの耐糖能および体重

表1に示す通り、20週齢の正常コントロールB A L B / cマウスでの知見と比較して、20週齢のK K / T aマウスは、空腹時血糖の上昇および耐糖能の低下並びに肥満を呈した ( $p < 0.01$ )。

#### 【0044】

【表 1】

表 1 : 実験動物データ

	BALB/c	KK/Ta
空腹時血糖値 (mg/dl)	76.4±9.5	110.2±25.3*
腹腔内グルコース注入後 120 分における血糖値 (mg/dl)	85.6±13.3	434.4±49.8*
体重 (g)	31.0±0.8	42.6±2.4*

\* KK/Ta における値 は BALB/c マウスにおける値より有意に高い ( $p < 0.05$ )。

## 【0045】

(5) TR-FIA および通常の競合イムノアッセイを用いた、2 種のマウス系統の尿中 IV 型コラーゲンの濃度の測定

TR-FIA の有用性を検討するために、マウス IV 型コラーゲンを、市販のキットを使用して競合的 ELISA によって同時に測定した。図 4 に示す通り、20 週齢の糖尿病の KK/Ta および糖尿病でない BALB/c マウスにおける尿の IV 型コラーゲンの濃度を、TR-FIA および競合的 ELISA の両方で測定した。各々の免疫測定において、BALB/c マウスより KK/Ta マウスの方が濃度は高かった ( $p < 0.01$ )。しかし、TR-FIA での濃度範囲は、競合的 ELISA での濃度範囲より高かった。さらに、TR-FIA では、KK/Ta と BALB/c マウス間の値の相違が、競合的 ELISA の場合よりも大きかった。正の相関関係がこれらの分析間で見られた (相関係数 = 0.607、 $p$  値 = 0.034)。

## 【0046】

(6) ノーザンプロット分析

図 5 に示す通り、IV 型コラーゲンの mRNA 発現は、BALB/c マウスと比較して KK/Ta マウスでより顕著に増加した。濃度測定スキニングにより、 $\alpha 1$  鎖の mRNA の発現が BALB/c マウスより KK/Ta マウスにおいて 11.1 倍高いことが示された。

## 【0047】

(C) 考察

病的腎臓では IV 型コラーゲンの産生が亢進することが報告されている (M. S. Razzaque, 他, J. Pathol., 1994, 174, 131-138; 及び T. A. Jacot, 他, Lab

. Invest., 1996, 75, 781-799)。これらの報告に加えて尿中 I V 型コラーゲン値について検討した様々なクリニカルスタディーの結果は、尿中 I V 型コラーゲンの増加が早期腎障害の良好な指標であることを示唆しているが、げっ歯動物から尿試料などの極少量の尿試料で利用できる高感度のアッセイ法は存在しなかった。現在使用されている通常の E L I S A は多量 ( $240 \mu\text{l}$ ) の試料が必要であるが、マウス尿は、1 回の排泄で極少量しか得られず、多量の検体採取が困難である。しかし、標識としてユウロピウムキレート化合物 ( $\text{B H H C T - E u}^{3+}$ ) を使用する T R - F I A を利用して、極少量の試料中の尿 I V 型コラーゲンを測定できることが判明した。

#### 【 0 0 4 8 】

I V 型コラーゲンは複数の構造上の特徴を有する巨大分子である。ゲルクロマトグラフィー分析によれば、尿試料中で I V 型コラーゲンは 340 kDa に最大ピークを有する (H. Makino, 他、Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 1995, 88, 215-223)。上記の通り、この巨大分子は、主な結合として多数のジスルフィド結合を各々有するポリマー単位から構成されている。一般にイムノアッセイは、測定すべき分子の大きさに伴いその複雑度が増すと言われている。D T T による前処理をしないアッセイでは、多量のコラーゲンが K K / T a マウスの尿に排泄されるにも拘わらず、高濃度の尿試料での蛍光強度は I V 型コラーゲンの量に比例しなかった。この正の相関関係の喪失は、抗原抗体反応の妨害が原因であり、自己凝集性の巨大分子ネットワークにより立体的に遮蔽されるものと考えられた。

#### 【 0 0 4 9 】

抗原抗体反応では、抗体は、抗原の表面上のペプチドのみを認識すると一般に考えられている (G. S. Page, 他、J. Virol., 1988, 62, 1781-1794)。2 mM の D T T と 2 mM のグアニジンを使用して Engelbreth-Holm-Swarm マウス腫瘍から I V 型コラーゲンを効率的に抽出したことが報告されている (H. K. Kleinman, 他、Biochemistry, 1982, 21, 6188-6193)。本発明では、D T T で多数のジスルフィド架橋を還元することによって、尿中の I V 型コラーゲンの分子の大きさを小さくして、抗体がコラーゲン分子の表面エピトープを十分に認識できるよ

うにすることを試みた。その結果、尿試料をDTTで前処理することによって、尿のIV型コラーゲンの濃度とTR-FIAのシグナル強度の間の正の相関関係を回復させた。ジスルフィド結合は、IV型コラーゲン分子の立体構造に関与する分子間及び分子内結合の一部を担っていると考えられる。2 mM以上のDTTを標準溶液に添加しても良好な結果が得られなかったことから、過剰な前処理は分子内ジスルフィド結合にも影響を与える結果、抗原のエピトープの立体構造に変化をもたらす可能性がある。

#### 【0050】

DTTによる前処理を行ったTR-FIAと市販のキットを用いる競合的ELISAは、BALB/cマウスよりもKK/Taマウスの方が尿IV型コラーゲンの濃度が高いという同様の傾向を示したが、これらのイムノアッセイでは以下のような明白な相違が見られた。

#### 【0051】

TR-FIAの濃度範囲は競合的ELISAの場合よりほぼ100倍近く高かった。これは、アッセイ法、使用した抗体、DTTの添加などの相違に起因するものである。DTTによる添加は、競合的ELISAの場合よりTR-FIAの場合におけるKK/TaとBALB/cマウスのさらなる相違の増加に寄与している可能性がある。TR-FIAの結果と同様に、ノーザンブロット分析でも、IV型コラーゲンのmRNAはBALB/cマウスの場合よりもKK/Taマウスの方が著明に発現が亢進していることが示された。この発現量の相違はTR-FIA分析の結果を支持するものである。TR-FIAでは5  $\mu$  lだけの尿試料が必要であったが競合的ELISAでは240  $\mu$  lが必要であった。TR-FIAではDTTによる前処理を行ったために少量の試料でも十分であった。

#### 【0052】

##### 【発明の効果】

本発明の方法によれば、極少量の試料中の微量のコラーゲンを測定することが可能になる。また、本発明の方法によれば、他の型のコラーゲンと交差反応することなくマウス系統間のコラーゲン量の相違を明確化することができる。本発明の方法を利用することにより、アルブミン等のタンパク質を指標とする従来のア

ッセイ法を使用する場合よりも、実験用モデルマウスにおけるより早期の腎障害をより感度よく評価することが期待される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、TR-FIA (A) 及び競合的 ELISA (B) によるマウス IV 型コラーゲンの標準曲線を示す。各点は、4 回の実験の平均  $\pm$  SD を示す。

【図 2】

図 2 は、IV 型コラーゲンを含むマウス尿の濃度と TR-FIA の蛍光強度との相関関係を示す。DTT の添加の前（白の四角と丸で示す）と後（黒の四角と丸で示す）の濃度は、KK/Ta 及び BALB/c の尿試料を用いて測定した。各点は、3 回の実験の平均  $\pm$  SD を示す。

【図 3】

図 3 は、尿及び標準試料に対する DTT 濃度の影響を示す。KK/Ta マウスからの尿試料及び標準溶液を 0、2 及び 5 mM の等量の DTT と一緒にインキュベートした。

【図 4】

図 4 は、20 週齢の KK/Ta ( $n=6$ ) 及び BALB/c ( $n=6$ ) マウスにおけるマウス尿 IV 型コラーゲン量の比較を示す。測定は、TR-FIA (A) 及び市販の競合的 ELISA (B) を用いて行った。

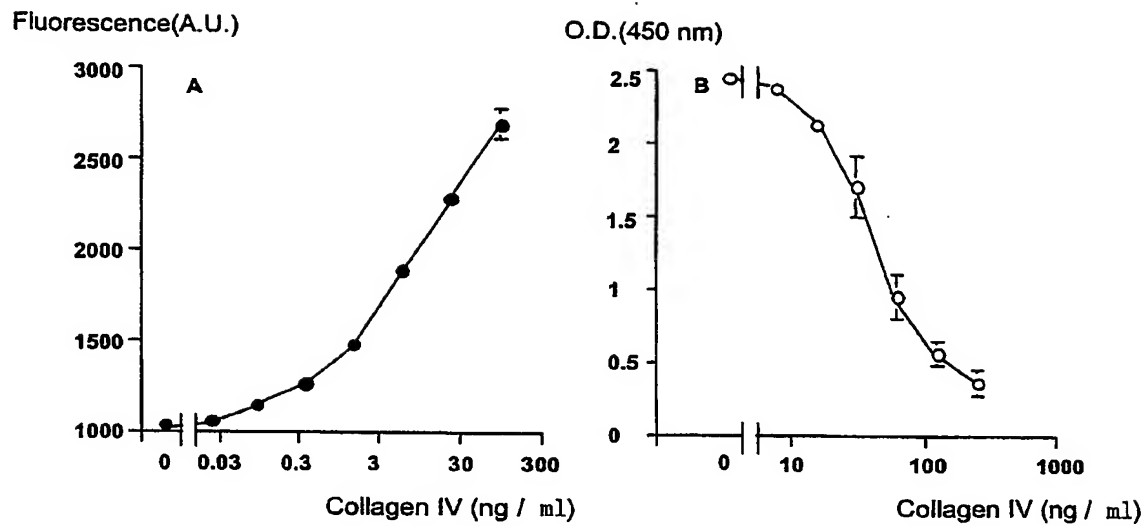
\* KK/Ta は BALB/c よりも有意に高い ( $p < 0.01$ )

【図 5】

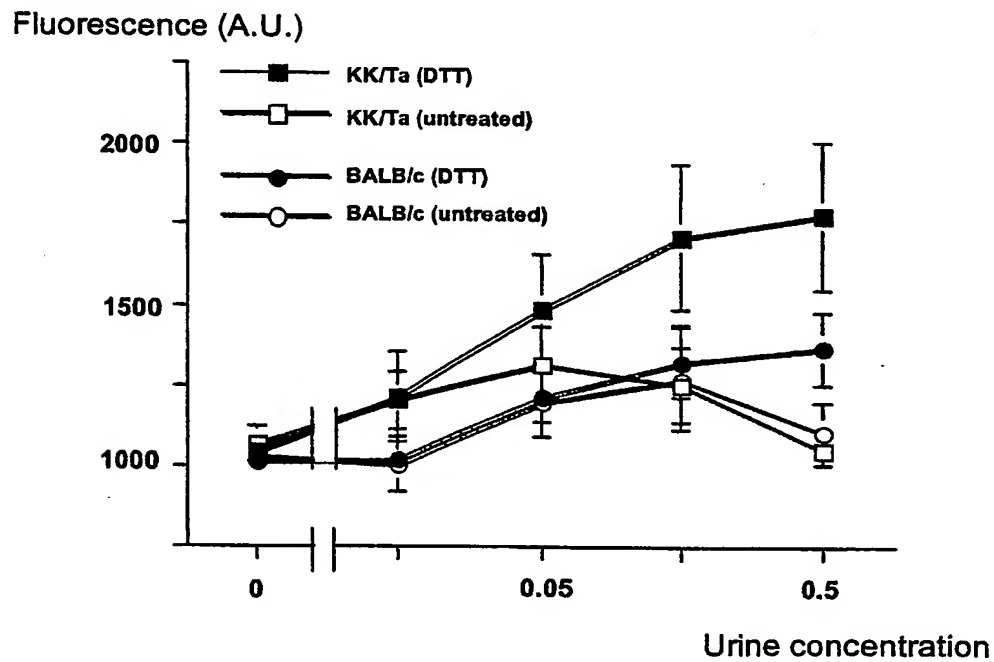
図 5 は、KK/Ta 及び BALB/c の全腎臓から単離した IV 型コラーゲン ( $\alpha 1$  鎖) の mRNA 発現を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

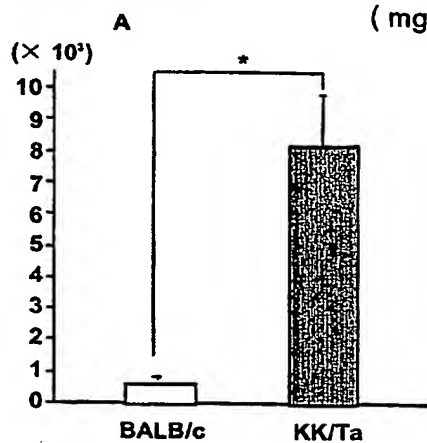
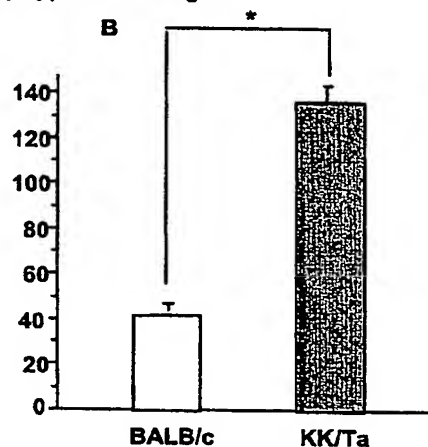


【図 2】



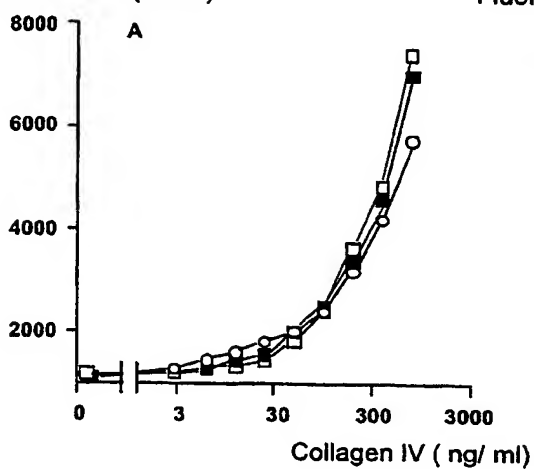


【図 3】

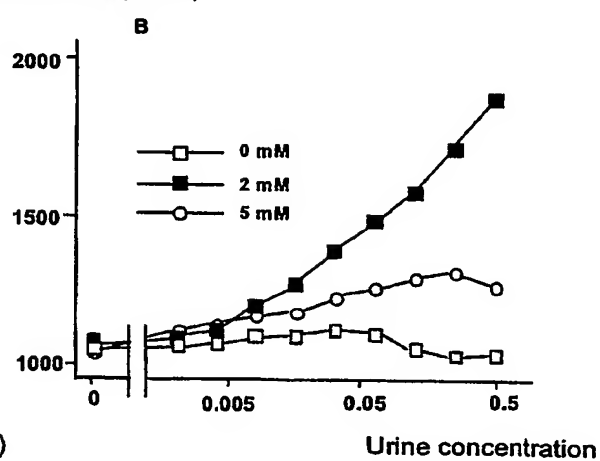
Mouse urinary type IV collagen  
(mg/g·Cr)Mouse urinary type IV collagen  
(mg/g·Cr)

【図 4】

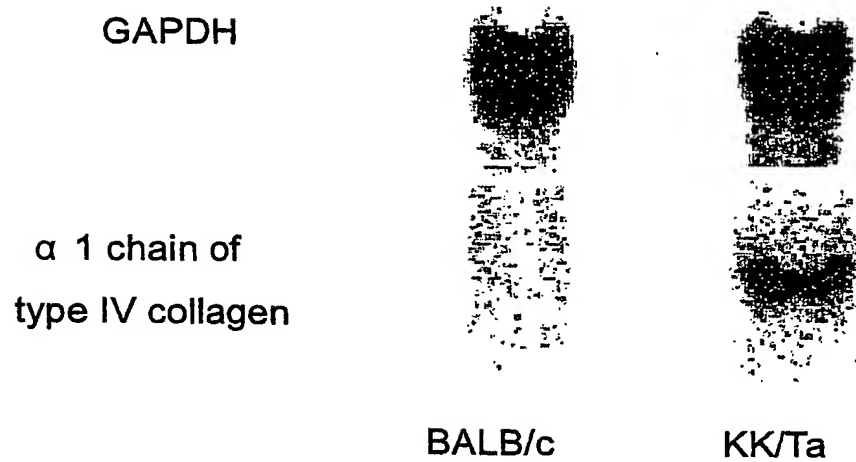
Fluorescence (A.U.)



Fluorescence (A.U.)



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウスの尿などの少量の試料しか得られない場合であっても、少量の試料中の微量のコラーゲンを測定することを可能にするコラーゲンの新規な測定方法を提供すること。

【解決手段】 抗コラーゲン抗体を用いる免疫分析によるコラーゲンの測定方法において被験試料を還元剤で処理することを特徴とする、コラーゲンの測定方法。

【選択図】 なし

特願 2002-271200

出願人履歴情報

識別番号

[502277924]

1. 変更年月日

2002年 7月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区初台一丁目37番11-309号

氏 名

工藤 憲雄